

Válasz Zimányi Lászlónak az MTA doktorának disszertációmról készített bírálatában feltett kérdéseire és megjegyzéseire

Tisztelt Bírálóm!

Megköszönöm hasznos, gondolatébresztő észrevételeit, kérdéseit. Válaszom a következő.

1. *A porózus, fraktálszerű aktívszén mintákkal kapcsolatos kérdés. Általánosítható-e a módszer egyéb porózus anyagokra is? Különösen érdekelne, hogy alkalmas lehet-e a röntgenszórás módszere porózus szilícium részecskék vizes oldatának a szerkezeti jellemzésére.*

Az egykristályból elektrokémiai maratással előállított porózus szilícium mindkét fajtája (a szivacsos és az oszlopos) tanulmányozható kisszögű röntgenszórással.

A porózus réteg vastagsága 100 μm körüli. Roncsolásos módszerrel ez a réteg tanulmányozható. A réteget elválasztva, azt apró darabkákra ($d < 10 \mu\text{m}$) őrölve transzmissziós technikával tanulmányozható a porozitás, a pórusok és a pórusok közötti átlagos falvastagság. Tekintettel arra, hogy a rendszer pórusainak átlagos kiterjedése 100 nm körüli, a röntgenszórással a kis szögek tartományában várható információ (ultra kisszögű röntgenszórás) (utalnék disszertációm 24. oldalán bemutatott 11. ábrájára).

A másik, lehetséges módszer a reflexió, pontosabban a súrlódó beesésű kisszögű szórás (GISAXS). Ebben az esetben a kiterjedt minta lapocskáját kell a nyalábba helyezni és a kétdimenziós szórási képet adott beesésű szögek (tipikusan 1, 3, 5°) mellett rögzíteni. Megjegyzem, hogy a szórási kép értelmezése jóval komplikáltabb, mint a transzmissziós esetben. Ennek a módszernek előnye, hogy nem kell a mintát roncsolni.

További lehetőségként kínálkozik a pórusok különböző elektronsűrűségű anyagokkal való feltöltése a pórusrendszer pontosabb leírása céljából (kontrasztvariációs lehetőség). A GISAXS módszer szinkrotronos mérőhelyet igényel.

A víz jelenléte esetében tekintettel kell lennünk annak röntgenabszorpciójára. 8 keV –os nyaláberergia esetében a vízréteg vastagsága ne haladja meg az 1 mm-t.

2. *A kloroplasztiszok gránum- és sztrómamembránjaival kapcsolatos, Garab Győző munkásságára utaló felvetés. Lát-e lehetőséget a szerző arra, hogy a kis- vagy nagyszögű röntgenszórás módszerével érdemben hozzá tudna járulni e szerkezetváltozások jellemzéséhez?*

Igen. Három éve kezdődött el a közös munkánk Garab Győzővel és munkatársaival. A természetes membránok tanulmányozása nagy kihívást jelent. A preparálási nehézségek, valamint az eddig használt laboratóriumi eszközökkel nyert szórásgörbék részkorrekciójának nagyfokú bizonytalansága jelentik a legnagyobb gondot. Közös munkánkban az áttörést az általunk épített „state of arts” szintű SAXS berendezés jelenti, ami közelítőleg szinkrotronnál elérhető minőségű szórásgörbét szolgáltat.

3. *A diklórfenol DPPC/víz rendszerre gyakorolt hatásával összefüggően a természetes membránokban előforduló kinonok tanulmányozása. Tudjuk azt, hogy a kinonok funkcionális szempontból csoportosulást, ú.n. „pool”-okat alkotnak a membránban. Érdekes lenne a jelölt által alkalmazott technikákkal megvizsgálni, hogy a kinon „pool”-ok nem jelentenek-e egyben térbeli csoportosulást a membrán egyes térrészeiben.*

A felvetett problémával biztosan eredményesen tudnánk foglalkozni. Első fázisban a disszertációban érintőlegesen említett molekulamechanikai és molekula dinamikai modellvizsgálatokat alkalmaznánk, amellyel tisztázni lehet, hogy a kinonok, mint „vendég (guest)” molekulák, és/vagy „vendég – gazda (host)” közötti kölcsönhatás eredményeképpen milyen csoportosulások alakulhatnak ki. A „pool”-ok létrejötte valószínűleg elegendő elektronsűrűségű kontraszt kialakulásával jár, ami feltétele a kisszögű technika eredményes használatának. A spektroszkópai valamint elektronmikroszkóppal (fagyasztatás után) kiegészített eredmények feltételezhetően elegendő információkkal szolgálnának a rendszer jellemzésére.

4. A 107. oldalon látható 80. ábrával kapcsolatos kérdésem. Honnan lehet tudni, hogy a DCP (=diklórfenol)/DPPC rendszer felületén fagyasztva töréssel láthatóvá tett hibahelyek, hexagonális szerkezetek környezetében megnőtt a diklórfenol aránya?

Fontos tény, hogy a rendszer gyengén elsőrendű (majdnem folytonos) fázisátmeneti állapotban van, ami nem következik be a „gazda” DPPC/víz rendszerben. A 80. ábrán olyan alakzatokat lehet megfigyelni, ami a DPPC/víz rendszerben nem fordul elő, tehát a DCP hatásának tulajdonítható. Az említett sajátosságokat felületi mintázatokként értelmeztem és nem szerkezetként (ezek nem hexagonális szerkezetek). A hullámos gél szerkezet a gél szerkezetből alakul ki, felületi hullámok kialakulásával kísérve. A spektroszkópai vizsgálatok igazolták, hogy a DCP a lipid molekulák nyaki részéhez illeszkedik (amit a DCP kémiai karaktere alapján jogosan fel is tételezhetünk). A DCP molekulák megnövekedett lokális koncentrációjával és a rendszer „frusztrált” állapotával tudom magyarázni a sajátos felületi mintázat kialakulását. A rendszer réteges szerkezetű, ami nem centroszimmetrikus formába (mint egy sokrétegű liposzóma), hanem cső alakjába van feltekeredve, ahogy az a 80. ábra baloldali képén látszik. A réteg felülete látható kinagyítva a 80. ábra jobboldali képén. A bemutatott morfológia nem tipikus, hanem lokális, „különleges” képződmény. Ennek kisszögű röntgenszórással megfigyelhető következményét nem tapasztaltam. Egyébként, domináns 12-14 nm periódusú felületi hullám (ami a P_{β} fázisban jelen van) diffrakciós jelét a kisszögű szórásgörbén kvázi Bragg csúcsként detektálható (csak megfelelő jel/zaj viszonyú szinkrotronos berendezés alkalmazásával).

5. A DBrP (dibrómfenol) növekvő koncentrációjával vékonyabb, egymásba hatoló lipid kettősréteg alakul ki. Ugyanakkor a mérések illesztése a 85. ábrán mintha azt mutatná, hogy a DBrP szennyező rétegeinek átlagos távolsága nem változik, csak az eloszlásának szélessége csökken az új fázisban. Ez ellentmondani látszik a kettősréteg elvékonyodásának; kérem, hogy a szerző ezt diszkutálja.

A kettősréteg összetolt gél fázisban történő elvékonyodását a 84. ábrán bemutatott szórásgörbe minden kétséget kizáróan mutatja (jobb oldali, felső ábra). A lipid kettősréteg távolsága egyértelmű. Probléma a DBrP molekulák elhelyezkedése. A 85. ábra az anomális módszerrel (ASAXS) nyert eredményt tartalmazza: csak a DBrP molekulák részecskesűrűségére vonatkozik. A 85. ábra azt mutatja, amit Bírálóm kiolvasott, azaz a DBrP szennyezőből álló rétegek átlagos távolsága lényegesen nem változik, csak az eloszlásának szélessége csökken az összetolt fázisban. Ez nincs ellentmondásban a kettősréteg elvékonyodásával; ez azt jelenti, hogy az ASAXS módszer alapján a DBrP molekulák a lipidek fejcsoportja által alkotott sík külső oldalán vannak.

Ez az ASAXS eredményre vonatkozik, kontrasztvariációs módszerrel a DBrP molekulák átlagos távolsága 3.4 nm helyett 2.5 nm. A jelentős eltérést a 111. oldalon diszkutálom, a probléma további részletes ismertetése a disszertációban idézett [214]. cikkben található (Varga, Bóta, Goerigk:

Localization of dihalogenated phenols in vesicle systems determined by contrast variation X-ray scattering. J. of Applied Crystallography 40 (2007) 205-208.).

6. Eukarióta membránokban, főleg plazmamembránokban, gyakori a lipid tutajok megjelenése. A szerző által alkalmazott röntgenszórásos technikák mennyiben tudnak, vagy tudnának információt szolgáltatni a lipid tutajok kialakulására, szerkezetére, tulajdonságára?

A biológiában fontos szerepet játszó lipid tutajok megfigyelését eddig FRET (fluorescence resonance energy transfer), SPT (single-particle tracking), multi foton laser scanning mikroszkópiás, NMR és AFM nagyműszeres módszerekkel végezték. A lipid tutajok méretével és összetételével kapcsolatban két szélsőséges feltételezés terjedt el: nagyméretű (> 50 nm), koleszterinben és szingolipidekben gazdag, illetve dinamikusan képződő kicsiny (<10 nm) domének léteznek. Általában a lipid tutajok 10 - 20 nm laterális kiterjedésű, alapvetően réteges szerkezetű domének. A lipid tutajok összetétele változó, a hordozó gazdamembrán összetételétől függ. A probléma innen származik; ugyanis ha a lipid tutajok összetételéből adódó, környezetéhez viszonyított elektronsűrűség kontraszt, a mérés adta feloldás adta szintet nem haladja meg, akkor nincs esélyünk a röntgenszórással történő megfigyelésre. A kontraszt növelésére a neutronszórás több lehetőséget kínál, mint a röntgen. Japán kutatók egyrétegű vezikulákban formálódó koleszterinben gazdag lipid doméneket (tutajokat) jellemeztek kisszőgű neutronszórás felhasználásával (Masui, Urakami és Imai: Nano-meter-sized domain formation in lipid membranes observed by small angle neutron scattering, European Physical Journal, E, 27 (2008) 379-389.). Unilamellás vezikulák laterális inhomogenitásának vizsgálatát személy szerint én is tervezem. A vizsgálatok kezdetének tekinthető a disszertáció 5.2.7 pontjában bemutatott, polialmasav tartalmú egyrétegű vezikulák jellemzésével foglalkozó munka. Egyébként a lipid tutajok, és ezzel kapcsolatban a koleszterin jelenléte által befolyásolt, egyidejűleg jelenlévő különböző mezomorf szerkezetű lipid-domének röntgenszórással történő vizsgálatával már foglalkoztam (Szegedi, Bóta: Effect of cholesterol on the structure of the fully hydrated dipalmitoyl-lecitin/water liposomes in the pretransition range, HASYLAB/Desy report, 2003.). A téma folytatását a 2. kérdésre adott válaszban említett SAXS berendezésünk jelenti, ami közel szinkrotronnál elérhető precíz szórásgörbék ad.

7. A szerző vizsgálja több antimikrobiális hatóanyag hatását mind a humán plazmamembrán, mind a bakteriális sejtmembrán lipidösszetételhez hasonló összetételű liposzómák szerkezetére. Ezekről az antibiotikumokról azonban tudott, hogy hatásukat nem – de semmiképpen nem elsősorban – a sejtmembránra fejtik ki, hanem a folsavsintézist, illetve a fehérjesintézist gátolják. Ráadásul a kísérletekben alkalmazott antibiotikum/lipid arányok, illetve bizonyos esetekben a hőmérséklet, nem tűnnek relevánsnak biológiai szempontból. Ezeket az eredményeket én csak fizikai kémiai érdekességük alapján tudom értelmezni.

Bírálómnak igaza van: az antibiotikumok nem elsősorban a membránra fejtik ki a hatásukat. A munkákat gyakorlati orvosi megfigyelés inspirálta, Dr. Kocsis Béla a pécsi orvosi egyetem, Mikrobiológiai és Immunológiai Intézetének, nagy nemzetközi tekintélynek örvendő, vezető kutató-orvosával folytatott beszélgetések során fogalmazódott meg e fizikai-kémiai jellegű munkáknak a célja. Az antibiotikumok hatása ugyan ismert, de hogyan jutnak be e molekulák a baktériumba? Képesek-e az antibiotikumok a plazmamembrán kettősrétegének „fellazítására”? Hasonló kérdések merültek fel a lipid-lipopoliszacharid rendszerekkel kapcsolatban is. A munka két biológus Ph.D. hallgatómmal (Urbán Edit, Oszlanczi Ágnes), és Kocsis doktor mikrobiológiai támogatásával folyt.

Urbán Edit doktori dolgozatának bírálója Garab Győző volt. Ő rögtön felismerte a vizsgálatok jelentőségét, a „kettősréteg” és „nem kettősréteg” lipidek eltérő szerkezetformáló hatásának, a membrán transzportfolyamatokban játszott szerepének tisztázását. Bírálómnak fenntartását megértve, azért még a következő érveket hoznám fel. 1) A rendelkezésre álló saját kisszögű berendezéssel csak szignifikáns szerkezeti változásokat lehetett tanulmányozni, tehát sokrétegű modellmembrán rendszereket kellett választanom a biológiailag releváns egyrétegű modell vagy a valós rendszerekből preparált membránképletek helyett. 2) A valós rendszerekben sok esetben nem ismeretes a vendégmolekulák lokális koncentrációja. Ha a lokális koncentráció nagy, akkor annak jellemezése a kísérletileg nagy vendégmolekula/lipid aránnyal rendelkező modellrendszerben történhet meg (disszertációm 3.2.4.2 fejezetének bevezető szakasza). 3) Laboratóriumi berendezésünk vonalfókuszú sugárnyalábbal volt felszerelve, tehát a biológiai rendszerekben várható, gyenge effektusok észlelésére alkalmatlan volt. 4) Valóban a fizikai-kémiai tulajdonságok, pontosabban a kisszögű szórással tanulmányozható nanoszerkezetek leírása volt a fő célom. Munkámat kissé izoláltam végeztem (inspirációt a gráci Biofizikai Intézetben szerzett tapasztalatok jelentették), ezzel magyarázom a konkrétabb biológiai jelenségek és fiziko-kémiai tulajdonságok közötti szorosabb kapcsolatok hiányát.

A hőmérséklet változtatásának lényege, hogy a fázisátmenetet kikényszerítsük a rendszerben, így a lipideknél ismeretes effektív alakváltozással járó, nanoszerkezetbeli változásokat követve, a rendszerről több információt szerezhetünk. A magas hőmérséklet biológiai rendszerek szempontjából sem irreleváns. Például, a bakteriális lipid rendszereknél a 60 °C feletti hőmérséklet a sterilizálással járó változásokat érinti. Baktériumokból preparált membránképletek termikus vizsgálatánál tapasztaltuk, hogy a membrán fehérjék denaturálódását a lipid kettősréteg fázisátalakulása előzi meg, a két folyamat a 62 – 70°C-os hőmérséklettartományban következik be.

8. Ugyanakkor érdemes lehet vizsgálni (..), a kaotróp és kozmotróp sók esetleges hatását a membránszerkezetre. A Hofmeister effektus szerint a különböző makromolekulákra és membránszerkezetekre a kaotróp sók lazító, a kozmotróp sók stabilizáló hatást fejtenek ki. Ez megnyilvánulhat pl. a fehérjék szerkezeti stabilitásában, de elképzelhető, hogy a tiszta lipid membránokéban is, és esetleg láthatóvá lehetne tenni a liposzómák röntgen-diffrakciós és kalorimetriás vizsgálatával. Végzett-e a jelölt ilyen tanulmányokat, vagy tud-e ilyen eredményekről az irodalomból?

A Hofmeister effektust még nem vizsgáltam. Ugyan, ezt Dér Andrással (SZBK) évek óta tervezgetjük. Ezzel kapcsolatban hasonló a véleményem, mint a korábbi kérdésekre adott válaszoknál, hogy az új SAXS berendezésünkkel váltunk technikailag alkalmassá a bírálóm által említett jelenségek tanulmányozására. Továbbá a termikus vizsgálatok mellett, kutatócsoportunkban a Hofmeister effektus vizsgálatát, spektroszkópiai mérésekkel valamint molekulamechanikai és molekuladinamikai szimulációval egészítenénk ki. Utóbbi, atomi léptékű vizsgálatok a lokális elektronsűrűség meghatározását tennék lehetővé, amellyel a kisszögű szórási görbék modellezését, azaz értelmezését könnyítenénk meg. Számos, Hofmeister effektussal kapcsolatos eredmény található az irodalomban.

például:

Clarke RJ, Lüpfer C.: Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect. Biophys J. 76(5) (1999) 2614-24.

Hadorn, M., Boenzli E., Eggenberger Hotz, P: A Quantitative Analytical Method to Test for Salt Effects on Giant Unilamellar Vesicles, Nature-Scientific Reports, 1, 168 (2011), doi:10.1038/srep00168

Aroti A., Leontidis E., Dubois M and Zemb T: Effects of Monovalent Anions of the Hofmeister Series on DPPC Lipid Bilayers Part I: Swelling and In-Plane Equations of State, Biophys J. 93(5) (2007) 1580–1590.

Rappolt M., Pabst G., Amenitsch H., Laggner P. Salt-induced phase separation in the liquid crystalline phase of phosphatidylcholines Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects , 183-185 (2001) 171-181.

Az első kettő a téma feldolgozásában ad támpontot, míg az utolsó kettőt a kisszögű szórás/diffrakció alkalmazását mutatja be. Az utolsó hivatkozásban közölt adatok minősége, a leírt adatfeldolgozás demonstrálja, hogy precíz, pontfókuszú geometriával felvett szórási görbékre van szükség. Laboratóriumi vonalfókuszú röntgenberendezés nem volt ideális eszköz a Hofmeister effektussal járó szerkezeti változások követésére.

9. A liposzómákban, mint nanoreaktorokban előállított kadmium-szulfid nanorészecskéket a szerző izolálni is tudta. Kár, hogy ennél látszólag nem ment tovább, nem jellemezte a nanorészecskéket pl. fényelnyelés és fényemisszió szempontjából. Nem teljesen világos számomra, hogy mi a jelentősége a liposzómák kettősrétegei közötti térnek, mint nanoreaktornak. Van valami különbség az itt előállított CdS részecskék és egyéb módszerekkel (oldatban, homogén vizes fázisban) előállított CdS részecskék között? Van-e gyakorlati jelentősége vagy előnye a liposzómákban történő szintézisnek.

A nanorészecskék széleskörű vizsgálatát elvégeztük (fényelnyelés és fényemisszió). A vizsgálatok egy része a megadott irodalomban van (Jákli, Taushanoff, Bóta és mtsai, US Patent [245]), de nagy részük még nem került publikálásra. A disszertációban a különböző rendszerek kisszögű szórási jellegzetességeinek bemutatására törekedtem, ezért nem szerepelnek a hiányolt eredmények. A liposzómák kettősrétegei közötti térben, szeparáltan található a prekursor ionok (ebben az esetben a Cd^{2+} ionok). Ezáltal a képződő nanorészecske Cd tartalma, így mérete is limitált. (Ez a nanoreaktor lényege.) Ezt a disszertáció 46, 47. oldalán kívántam megvilágítani. Homogén fázisban nem nanorészecskék, hanem lényegesen nagyobb részecskék alakulnak ki. Liposzómában történő előállítás során a CdS nanorészecskék felületét spontán módon foszfolipid réteg vonja be, ami a részecskéket stabilizálja. (Az előállítás után a DPPC/CdS vizes rendszert szárítószekrénybe raktam /kb 80°C, és kíméletesen megszáritottam. A száradt lipid/CdS rendszert alkoholban szuszpendálva, ultracentrifugálás után a lipid nagy részét tartalmú felülúszót eltávolítottam. Az alkoholos szuszpenzió beszárítás után vízben könnyen szuszpendálható volt és stabil (nem ülepedő, nem aggregálódó) vizes CdS nanorészecske szuszpenziót nyertem.)

A konkrét kérdésekre adott válasz után még egy számomra fontos, bírálóm által tett kijelentésre szeretnék reflektálni, konkrétan „A másik terület a biológiai jelentőséggel (noha erősen korlátozott jelentőséggel) is bíró liposzómák szerkezeti vizsgálata” véleménnyel kapcsolatban. A mérési módszer fejlesztése, a jelenlegi műszeres háttér adta lehetőségek, valamint sokrétegű vezikulákkal szerzett tapasztalatok adták az alapot a jelenlegi munkákhoz. A disszertációban bemutatott egyrétegű vezikulák túlzás nélkül nagyon nagy jelentőséggel bírnak. A hatóanyagok szervezeten belüli célzott bevitelére alkalmas nanohordozók jelentős része vezikula. Tehát e

rendszerek kutatása mind gyógyszeripari mind orvosi szempontból kiemelt fontosságú, továbbá a biológiai képalkotásban is nélkülözhetetlen szerephez jutottak. Ehhez kapcsolódóan osztályunk a következő munkákban vett részt: „Nanorészecskéhez kötött molekulárisan célzott daganatellenes jelátviteli gyógyszerhatóanyag és kapcsolódó diagnosztika integrált fejlesztése” című Kutatás-fejlesztési Pályázat, 2008-2012., „Intelligens nanoszenzor fejlesztése az ionháztartás folyamatainak szubcelluláris szintű diagnosztizálására” című Kutatás-fejlesztési Pályázat, 2009-2012., a gyógyszergyárral folyó kutatások 2010-ben kezdődtek. A legutóbbi két évben – minden bizonnyal sok meglepetést tartogató – természetes vezikulák, ún. exoszómák jellemzése irányába fordult érdeklődésem.

Tisztelettel és köszönettel:

Bóta Attila

Budapest, 2013. 10. 12.